

<https://doi.org/10.31043/2410-2733-2020-2-16-20>

УДК 57.023:57.085.2

П. В. Борискин¹, О. Н. Гуленко², А. А. Девяткин¹, Р. Г. Каримова³, В. В. Леонов², О. Н. Павлова¹,
А. Н. Тороповский¹

Корреляции концентрации ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга крыс

Аннотация. Нарушения нормального метаболизма приводят к повышенной генерации в клетках активных форм кислорода, избыток которых создает условия для формирования окислительного стресса. По целому ряду причин мозг наиболее чувствителен к этому состоянию: ткани мозга приспособлены к высокому потреблению кислорода, они содержат больше окисляемого субстрата и менее активную систему антиоксидантной защиты. Поэтому оксидативный стресс можно отнести к наиболее значимым механизмам повреждения нейроцитов и глии, так как он запускает патологические реакции, необратимо травмирующие клетки и приводящие к запуску генетически запрограммированной гибели нейронов — апоптозу. В статье представлено исследование взаимосвязей распределения концентраций ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга белых беспородных крыс. С помощью коэффициентов корреляции Спирмена, гамма корреляции и Кендалла Тау выявлено, что при изучении распределения активности ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга крыс выявлены достоверные прямые корреляционные связи слабой силы между активностью СОД в сыворотке крови и тканях мозга крыс ($\text{Gamma} = 0,12$ при $p \leq 0,039282$; $\text{Kendall Tau} = 0,11$ при $p \leq 0,039282$) и концентрацией диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях мозга крыс ($\text{Gamma} = 0,16$ при $p \leq 0,007167$; $\text{Kendall Tau} = 0,15$ при $p \leq 0,007167$).

Ключевые слова: оксидативный стресс; ткани мозга; сыворотка крови; каталаза; супероксиддисмутаза; глутатионпероксидаза; глутатионредуктаза; малоновый диальдегид; диеновые конъюгаты.

Авторы:

Борискин Павел Викторович — кандидат медицинских наук; e-mail: pboriskin@mail.ru;

Гуленко Ольга Николаевна — кандидат биологических наук; e-mail: gulenko_ol@mail.ru;

Девяткин Анатолий Анатольевич — доктор медицинских наук;

Каримова Руфия Габдельхаевна — доктор биологических наук, профессор;

Леонов Виктор Валериевич — лаборант;

Павлова Ольга Николаевна — доктор биологических наук; e-mail: casiopeya13@mail.ru;

Тороповский Андрей Николаевич — кандидат медицинских наук.

¹ ООО «ТестГен»; 432072, Россия, г. Ульяновск, 44-й проезд Инженерный, 9;

² Медицинский университет «Реавиз»; 443001, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 227;

³ ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана»; 420029, Россия, Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

Введение. Одним из главных звеньев, обеспечивающим всестороннюю функциональную активность теплокровных организмов является центральная нервная система. Следует отметить, что она также является одной из наиболее метаболически активных тканей. Нейроны являются высокоспециализированными, обеспечивающими адаптационные процессы к эндо- и экзофакторам среды, клетками. Полноценное функционирование нейронов требует больших затрат энергии — даже

в состоянии покоя нервные клетки потребляют около 20% от общего количества кислорода, необходимого для обеспечения жизнедеятельности организма в целом. Нервной ткани требуется непрерывное насыщение ее кислородом, а любые ограничения его поступления даже на небольшие промежутки времени могут приводить к тяжелым последствиям и вызывать гибель как нейроцитов, так и клеток глии. Однако, потребление большого количества кислорода нервной тканью акти-

визирует окисление и провоцирует образование активных форм кислорода (АФК). Эту ситуацию усугубляет тот факт, что головной мозг в своем составе содержит большое количество полиненасыщенных жирных кислот, которые легко окисляются с образованием токсичных продуктов. Благодаря наличию гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), защищающему нервную ткань от токсичных соединений, проникновение продуктов окисления в нейроны и глию затруднено. В противовес процессам окисления в организме работают антиоксиданты эндогенного и экзогенного происхождения. В частности, благодаря им АФК переводятся в безопасные неактивные соединения. Гематоэнцефалический барьер в контексте оксидативного стресса усугубляет действие АФК на нейроны и клетки глии, так как не пропускает к ним некоторые антиоксиданты, в частности витамин Е [1, 2].

Отдельно следует отметить, что клетки микроглии защищают нейроны головного мозга и активируют иммунные механизмы в ответ на поступление токсичных веществ. Установлено, что при оксидативном стрессе в микроглии накапливаются медиаторы воспаления — цитокины, провоцирующие выработку АФК и азота, которые в конечном итоге формируют замкнутый круг оксидативного стресса и воспаления. Эти процессы могут быть и пусковыми механизмами друг для друга и усиливающими факторами. Все это достаточно быстро сказывается на структуре и функции клеток головного мозга. Дело в том, окислительный стресс обеспечивает дополнительный поток ионов во внутреннюю среду клетки, за счет гиперстимуляции рецепторов глутаматом на фоне нарушенной функциональности митохондрий и это, в конечном счете, приводит к гибели нейронов [3].

На данный момент ключевыми звеньями повреждения клеток при оксидативном стрессе, считается митохондриальная дисфункция, нарушение глутатионового обмена и накопление железа в базальных ганглиях при ряде нейродегенеративных заболеваний. Первично образованные свободные радикалы накапливаются и увеличивают патогенетическое действие за счет подавления митохондриальной функциональности, нарушения продукции НАДФ•Н, снижения количества глутатиона и редокс-потенциала клетки, тем самым усиливая окислительное повреждение тканей [4, 5, 6].

Таким образом, рассмотренные особенности нервной системы обуславливают подверженность клеток головного мозга действию свободных радикалов [1], а оксидативный стресс — важнейший фактор повреждения нервной ткани.

Цель исследований — изучение взаимосвязей распределения концентраций ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга белых беспородных крыс.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие задачи: определить концентрацию каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови и тканях мозга белых беспородных крыс; выявить взаимосвязи распределения концентраций ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга крыс.

Материалы и методы. Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах 4-х месячного возраста, массой 220–240 г в количестве 150 штук, которые содержались в виварии при свободном доступе к воде и пище.

Исследование выполнено в соответствии с правилами лабораторной практики в Российской Федерации: приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.; приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.; закон «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 104679-ГД от 01.12.1999 г.

Определение концентрации малонового диальдегида проводили по методу В. В. Рогожина [7]. С помощью метода М. А. Королюка определяли активность каталазы [8]. Методом В. С. Гуревича определяли активность СОД [9]. Выявление активности ГП осуществляли по методу В. М. Мойн, а активность ГР и ДК определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм и 233 нм соответственно [10].

Концентрации ферментов изучали в тканях мозга и сыворотке крови малых экспериментальных животных. Для этого крыс убивали под эфирным наркозом методом декапитации в соответствии с этическими нормами, а затем проводили извлечение мозга, который промывали физиологическим раствором. Из тканей мозга готовили гомогенаты путем механического измельчения мозга массой 1 г с 9 мл трис-буфера (рН 7,4), со скоростью 5000 об/мин в сосуде с двойными стенками, постоянно охлаждаемым проточной водой [10].

Цифровой материал подвергали статистической обработке путем непараметрического корреляционного анализа по Спирмену, а также с использованием коэффициентов гамма корреляции и Кенделла Тау.

Результаты и их обсуждение. По окончании опыта получен массив числовых данных, отражаю-

щих значение концентраций ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и мозге малых экспериментальных животных. Эти данные на первом этапе были подвергнуты статистической обработке с целью проверки на соответствие нормальному распределению концентраций каталазы, СОД, ГП, ГР, МДА и ДК в сыворотке крови и тканях мозга (табл. 1) с использованием одновыборочного критерия Колмогорова-Смирнова.

В результате установлено, что распределение концентраций изучаемых ферментов не соответствует нормальному, поэтому на втором этапе мы использовали непараметрические методы анализа для поиска корреляций с использованием коэффициентов Спирмена (табл. 2), гамма корреляции (табл. 3) и Кенделла Тау (табл. 4).

По данным таблицы 2 очевидно наличие достоверной прямой корреляционной связи слабой силы между активностью СОД в сыворотке крови

и тканях мозга (Spearman $R = 0,16$ при $p \leq 0,048423$) и концентрацией диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях мозга (Spearman $R = 0,21$ при $p \leq 0,010654$).

По данным таблицы 3 определяется наличие прямых достоверных корреляционных связей слабой силы между активностью СОД в сыворотке крови и тканях мозга крыс (Gamma $0,12$ при $p \leq 0,039282$) и концентрацией диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях мозга крыс (Gamma $0,16$ при $p \leq 0,007167$).

По данным, представленным в таблице 4 также определяется наличие прямых достоверных корреляционных связей слабой силы между активностью СОД в сыворотке крови и тканях мозга крыс (Kendall Tau = $0,11$ при $p \leq 0,039282$) и концентрацией диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях мозга крыс (Kendall Tau = $0,15$ при $p \leq 0,007167$).

Таблица 1. Распределение значений концентраций ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга малых экспериментальных животных

Описательная статистика объединённых групп	N	M	Me	Min	Max	25 Perc	75 Perc	10 Perc	90 Perc
<i>Каталаза</i>									
Сыворотка крови	150	19,72	19,60	17,40	22,10	18,90	20,40	18,35	21,40
Мозг	150	11,08	11,20	9,20	12,70	10,50	11,70	9,75	12,20
<i>Супероксиддисмутаза</i>									
Сыворотка крови	150	29,01	29,10	27,30	30,70	28,40	29,60	28,00	30,20
Мозг	150	75,64	75,70	74,10	77,40	75,20	76,20	74,80	76,50
<i>Глутатионпероксидаза</i>									
Сыворотка крови	150	123,50	123,50	122,10	125,10	123,10	124,20	122,60	124,70
Мозг	150	126,10	126,15	124,80	127,90	125,40	126,70	125,20	127,00
<i>Глутатионредуктаза</i>									
Сыворотка крови	150	70,75	70,80	69,40	71,80	70,40	71,20	69,80	71,60
Мозг	150	41,62	41,70	40,10	42,90	41,20	41,90	40,80	42,40
<i>Малоновый диальдегид</i>									
Сыворотка крови	150	6,31	6,35	5,30	7,90	5,90	6,70	5,70	6,90
Мозг	150	9,84	9,80	8,30	11,50	9,40	10,40	8,70	10,60
<i>Диеновые конъюгаты</i>									
Сыворотка крови	150	34,31	34,30	32,90	35,60	33,90	34,70	33,50	35,10
Мозг	150	16,36	16,40	15,10	17,90	15,80	16,80	15,40	17,40

Таблица 2. Коэффициент корреляции Спирмена по распределению концентрации ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга крыс и значение p

Корреляция по Спирмену во всех объединённых измерениях	Фермент	Valid N	Spearman R	p-level
Сыворотка крови & мозг	Каталаза	150	-0,054795	0,505419
	Супероксиддисмутаза	150	0,161438	0,048423
	Глутатионпероксидаза	150	0,020437	0,803957
	Глутатионредуктаза	150	-0,052943	0,519936
	Малоновый диальдегид	150	0,009695	0,906270
	Диеновые конъюгаты	150	0,207976	0,010654

Выводы. Таким образом, все три способа непараметрического корреляционного анализа для оценки взаимосвязи распределения концентрации ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга крыс выявили, что при концент-

рации СОД и ДК в организме животных в пределах физиологической нормы достоверно определяется слабая прямая корреляционная связь между активностью этих ферментов в сыворотке крови и тканях мозга.

Таблица 3. Коэффициент гамма корреляции по распределению концентрации ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга крыс

Корреляция во всех объединённых измерениях	Фермент	Valid N	Gamma	Z	p-level
Сыворотка крови & мозг	Каталаза	150	-0,040822	-0,71553	0,474282
	Супероксиддисмутаза	150	0,119430	2,061217	0,039282
	Глутатионпероксидаза	150	0,014160	0,243504	0,807615
	Глутатионредуктаза	150	-0,041535	-0,706306	0,479998
	Малоновый диальдегид	150	0,007768	0,132853	0,894310
	Диеновые конъюгаты	150	0,156569	2,68899	0,007167
MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p<0,05					

Таблица 4. Коэффициент Кендалла Тау корреляции по распределению концентрации ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях мозга

Корреляция во всех объединённых измерениях	Фермент	Valid N	Kendall Tau	Z	p-level
Сыворотка крови & мозг	Каталаза	150	-0,039403	-0,71553	0,474282
	Супероксиддисмутаза	150	0,113509	2,061217	0,039282
	Глутатионпероксидаза	150	0,013409	0,243504	0,807615
	Глутатионредуктаза	150	-0,038895	-0,706306	0,479998
	Малоновый диальдегид	150	0,007316	0,132853	0,894310
	Диеновые конъюгаты	150	0,148079	2,68899	0,007167
MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p<0,05					

Литература

1. Баринов А. Н. Роль окислительного стресса в заболеваниях нервной системы — пути коррекции / А. Н. Баринов // Трудный пациент. — 2012. — № 1. — С. 10–13.
2. Мартынов М. Ю. Окислительный стресс у больных с мозговым инсультом / М. Ю. Мартынов, А. Н. Ясманова, Т. И. Колесникова // Consilium medicum. Неврология. — 2010. — № 2. — С. 14–17.
3. Мажитова М. В. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная защита разных отделов центральной нервной системы на этапах постнатального онтогенеза белых крыс в норме и при действии промышленных серосодержащих поллютантов: Автореф. док. биол. наук Астрахань, 2012. 45 с.
4. Schulz J. B. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration / J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, J. Dichgans // Eur. J. Biochem. — 2000. — № 267. — P. 4904–4911.
5. Fornai F. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein / F. Fornai, O. M. Schluter, P. Lenzi et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — № 102. — P. 3413–3418.
6. Васенина Е. Е. Диагностика и лечение умеренного когнитивного расстройства / Е. Е. Васенина, О. С. Левин // Нейропротективная терапия. — 2013. — № 3–4. — С. 39–46.
7. Коробейникова О. Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой / О. Н. Коробейникова // Лаб. дело. — 1989. — № 7. — С. 8–10.
8. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Т. Майорова // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19
9. Максимович Д. И. Исследование активности антиоксидантных ферментов у крыс с экспериментальным метаболическим синдромом / Д. И. Максимович, Е. О. Корик // Интернаука. — 2017. — № 12–1(16). — С. 10–12
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.

Boriskin P.¹, Gulenko O.², Devyatkin A.¹, Karimova R.³, Leonov V.², Pavlova O.¹, Toropovsky A.¹

The correlation between the concentration of enzymes of the POL-AO system in serum and rat brain tissue

Abstract. *Violations of normal metabolism lead to increased generation of active oxygen forms in cells, the excess of which creates conditions for the formation of oxidative stress. For a variety of reasons, the brain is most sensitive to this condition: brain tissue is adapted to high oxygen consumption, they contain more oxidized substrate and less active antioxidant protection system. Therefore, oxidative stress can be attributed to the most significant mechanisms of neurocyte and glia damage, as it triggers pathological reactions that irreversibly damage cells and lead to the launch of genetically programmed neuronal death — apoptosis. The article presents the study of interrelationships between the concentration distribution of enzymes of POL-AO system in blood serum and brain tissue of white pedigree rats. Using Spirman, Gamma and Kendel Tau correlation coefficients it was revealed that studying the activity distribution of enzymes of POL-AO system in blood serum and rat brain tissues reliable direct correlation links of weak force between SOD activity in blood serum and rat brain tissues were revealed (Gamma = 0.12 at $p \leq 0.039282$; Kendall Tau = 0.11 at $p \leq 0.039282$) and the concentration of diene conjugates in rat serum and rat brain tissue (Gamma = 0.16 at $p \leq 0.007167$; Kendall Tau = 0.15 at $p \leq 0.007167$).*

Keywords: oxidative stress; brain tissue; serum; catalase; superoxydismutase; glutathione peroxidase; glutathione reductase; malonaldehyde; diene conjugates.

Authors:

Boriskin P. — PhD (Med. Sci.); research associate; e-mail: pboriskin@mail.ru;

Gulenko O. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: gulenko_ol@mail.ru;

Devyatkin A. — PhD (Med. Sci.); research associate;

Karimova R. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), professor;

Leonov V. — laboratory assistant;

Pavlova O. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), research associate; e-mail: casiopeya13@mail.ru;

Toropovsky A. — PhD (Med. Sci.); general director LLC «TestGen».

¹ LLC TestGen; 432072, Russia, Ulyanovsk, 44th passage Engineering, 9;

² Medical University «Reaviz»; 443001, Russia, Samara, st. Chapaevskaya, 227;

³ FSBEI of HE «Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman»; 420029, Russia, Kazan, ul. Siberian tract, 35.

References

1. Barinov A. N. The role of oxidative stress in diseases of the nervous system — the path of correction / A. N. Barinov // Difficult patient. — 2012. — №. 1. — P. 10–13.
2. Martynov M. Yu. Oxidative stress in patients with cerebral stroke / M. Yu. Martynov, A. N. Yasamanova, T. I. Kolesnikova // Consilium medicum. Neurology. — 2010. — №. 2. — P. 14–17.
3. Mazhitova M. V. Free-radical processes and antioxidant protection of different parts of the central nervous system at the stages of post-rat ontogenesis of white rats are normal and under the action of industrial sulfur-containing pollutants: Author's abstract. doc biol. Sciences Astrakhan, 2012. 45 p.
4. Schulz J. B. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration / J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, J. Dichgans // Eur. J. Biochem. — 2000. — №. 267. — P. 4904–4911.
5. Fornai F. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein / F. Fornai, O. M. Schluter, P. Lenzi et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — №. 102. — P. 3413–3418.
6. Vasenina E. E. Diagnosis and treatment of moderate cognitive impairment / E. E. Vasenina, O. S. Levin // Neuroprotective therapy. — 2013. — №. 3-4. — P. 39–46.
7. Korobeinikova O. N. Modification of the determination of lipid peroxidation products in reaction with thiobarbituric acid / O. N. Korobeinikova // Lab. business. — 1989. — №. 7. — P. 8–10.
8. Korolyuk M. A. Method for the determination of catalase activity / M. A. Korolyuk, L. I. Ivanova, I. T. Mayorova // Lab. business. — 1988. — №. 1. — P. 16–19.
9. Maksimovich D. I. Study of the activity of antioxidant enzymes in rats with experimental metabolic syndrome / D. I. Maksimovich, E. O. Korik // Internauka. — 2017. — №. 12–1(16). — P. 10–12.
10. Guidance on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / under total. ed. RU. Khabrieva. 2-ed., Revised. and add. M.: Medicine, 2005. 832 p.